CLIPPEDIMAGE= JP02000321206A

PAT-NO: JP02000321206A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2000321206 A

TITLE: FLUORESCENCE MEASURING METHOD AND DEVICE

PUBN-DATE: November 24, 2000

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
YURINO, YORIKO	N/A
YAMAMOTO, KENJI	N/A
SHISHIDO, KENTARO	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HITACHI SOFTWARE ENG CO LTD	N/A

APPL-NO: JP11129365

APPL-DATE: May 11, 1999

INT-CL (IPC): G01N021/64;G01N021/78

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To use a continuous oscillation laser for an excitation light source and easily achieve accurate detection by moving a sample where excitation light from the excitation light source is applied on the light axis of a fluorescence detection means for detecting the incident fluorescent light.

SOLUTION: A circular biochip 10 where a number of sample spots are arranged is rotated and driven in a direction marked by an arrow R by a rotary motor. A continuous oscillation (CW) laser 30 that is an excitation light source and the optical head of optical systems 40 and 50 for applying the excitation light and detecting fluorescence is placed at the upper portion of the biochip 10. Then, excitation light from the CW laser 30 is applied to one sample spot 11a on the rotating biochip 10 via an excitation application optical system 40 to excite a fluorescent substance in a sample spot 11a. After that, the sample spot 11a where the excitation light is applied is moved along with the rotation of the biochip 10 and reaches immediately below the fluorescence detection optical system 50. Fluorescence being generated from the sample spot 10a at this position enters the fluorescence detection optical system 50 for detection.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号
特開2000－321206
（P2000－321206A）
(43)公開日　平成12年11月24日(2000.11.24)

(51)Int.Cl.⁷	識別記号	ＦＩ	テーマコード(参考)
Ｇ０１Ｎ　21/64		Ｇ０１Ｎ　21/64	Ｆ　２Ｇ０４３
21/78		21/78	Ｃ　２Ｇ０５４

審査請求　未請求　請求項の数４　ＯＬ　（全 ６ 頁）

(21)出願番号　特願平11－129365

(22)出願日　平成11年５月11日(1999.5.11)

(71)出願人　000233055
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社
神奈川県横浜市中区尾上町６丁目81番地

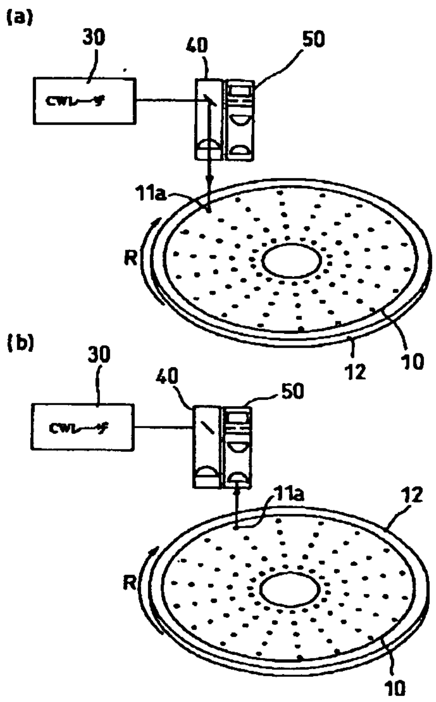
(72)発明者　百合野　以子
神奈川県横浜市中区尾上町６丁目81番地
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社内

(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　蛍光測光方法及び蛍光測光装置

(57)【要約】
【課題】　励起光源として連続発振レーザを用い、簡単な構成で容易に高い検出精度を得る。
【解決手段】　励起光源３０からの励起光を試料１１ａに照射した後、試料を蛍光検出手段５０の光軸上に移動して蛍光を検出する。



1

【特許請求の範囲】

【請求項１】　励起光源からの励起光を試料に照射するステップと、
励起光を照射された試料を蛍光検出手段の光軸上に移動するステップと、
前記蛍光検出手段に入射した蛍光を検出するステップとを含むことを特徴とする蛍光測光方法。

【請求項２】　請求項１記載の蛍光測光方法において、試料は蛍光物質で標識された生体高分子を含むことを特徴とする蛍光測光方法。

【請求項３】　励起光源と、前記励起光源からの励起光を試料に照射するための励起光照射手段と、前記励起光照射手段の光軸と試料上で交差しない光軸を有し、励起光照射によって試料から発せられた蛍光を検出するための蛍光検出手段と、前記励起光照射手段によって励起光を照射された試料を前記蛍光検出手段の光軸上に移動するための試料移動手段とを備えることを特徴とする蛍光測光装置。

【請求項４】　請求項３記載の蛍光測光装置において、前記試料移動手段は試料を回転移動させる手段であり、異なる波長の蛍光を検出するために前記励起光源と励起光照射手段と蛍光検出手段の組を複数組備えることを特徴とする蛍光測光装置。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、蛍光測光方法及び蛍光測光装置に関し、特に蛍光物質で標識されたＤＮＡや蛋白質などの試料が平面状に配列されているバイオチップの読み取りに好適な蛍光測光方法及び蛍光測光装置に関する。

【０００２】

【従来の技術】分子生物学や生化学の分野では、既知の配列をもつ核酸や蛋白質と試料中のターゲット分子とをハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション反応を利用して有用な遺伝子の探索や病気の診断などが行われている。その際、短時間で大量の試料を処理するために表面に多数の試料スポットを配列したバイオチップが用いられる。バイオチップ上の各試料スポットにはそれぞれ異なるプローブが固定されており、このバイオチップを試料ＤＮＡと共に反応容器の中に入れ、その中でバイオチップの各試料スポットに結合させたプローブと蛍光標識した試料ＤＮＡとのハイブリダイゼーションを行う。その後、バイオチップに励起光を照射し、各試料スポットから発せられる蛍光強度を蛍光測光装置で測定することによって、各プローブと試料ＤＮＡとの結合量を知り、それを必要な情報に変換する。

【０００３】図５は、バイオチップの読み取りに使用される従来の蛍光測光装置の概略図である。この蛍光測光装置は、バイオチップ上の各試料スポットに対して光点走査方式で励起光照射を行い、各試料スポットから発せ

2

られる蛍光の取り込みを光ファイバー束により行うようにしたものである。

【０００４】スライドグラス等から成るバイオチップ１００の表面には、蛍光物質により標識されたＤＮＡや蛋白質などを含む試料スポット１０１が、例えば直径５０μｍの微小なスポットとしてＹ方向に１００μｍ程度の間隔で格子状に配列されている。バイオチップ１００はチップ送りモータ１０３により矢印Ｙで示す方向に平行移動される。レーザ１０５から発生されたレーザ光１０７は回転ミラー１０９で反射されてバイオチップの表面に光点となって導かれる。回転ミラー１０９はモータ１１１により矢印Ｒ方向に回動される。従って、レーザ光１０７はバイオチップ１００の表面を矢印Ｘ方向に直線走査する。このように、モータ制御部１１９によってチップ送りモータ１０３及びモータ１１１を制御して、Ｘ方向にレーザ光を走査し、Ｙ方向にバイオチップを逐次移動することで、バイオチップ１００の試料面全体を光照射していた。

【０００５】バイオチップの各試料スポットから発生された蛍光は、光ファイバー束１１３ａ，１１３ｂによって光電子増倍管（photomultiplier tube；ＰＭＴ）１１５ａ，１１５ｂに導かれる。光ファイバー束１１３ａ，１１３ｂの入射側はライン状に配列され、バイオチップ１表面のレーザ光走査線に向けられている。また、光ファイバー束１１３ａ，１１３ｂの他端は束ねてＰＭＴ１１５ａ，１１５ｂに向けて配置されている。光ファイバー束１１３ａ，１１３ｂとＰＭＴ１１５ａ，１１５ｂの間には光学フィルタ１１７ａ，１１７ｂが配置されており、目的の蛍光波長のみをＰＭＴ１１５ａ，１１５ｂで読み取るようになっている。ＰＭＴ１１５ａ，１１５ｂの出力はデータ処理部１２１に送られてデータ処理される。このように透過波長域の異なる光学フィルタを備える受光系を複数設置することで、多色の読取りを可能にしていた。

【０００６】

【本発明が解決しようとする課題】上記した従来の蛍光測光装置は、受光系に試料からの蛍光だけでなく、試料面で反射あるいは散乱された励起レーザ光が入っていた。試料が微量なこともあって、受光系に入射する励起光の光量は蛍光の光量より数桁も大きい。従って、励起光を除去するために光学フィルタとして透過波長帯域が狭いものを用いる必要があり、検出すべき蛍光も光学フィルタによってカットされることがあった。また、蛍光の取り込みに用いる光ファイバー束は、光走査方向に少なくとも試料の個数に等しい本数の光ファイバーが必要でコスト面で不利になる上、光ファイバーの光軸合わせに精密な機構と調整を要していた。

【０００７】また、光ファイバーは受光角が小さく試料から取り込める蛍光が少ないために、Ｓ／Ｎ比が低くなる傾向がある。Ｓ／Ｎ比をあげるためにパルスレーザや

音響光学変調器（acoustooptic modulator；ＡＯＭ）を用い、試料を励起した直後に励起レーザ光の強度を減衰させて試料の蛍光だけを受光する試みもあるが、パルスレーザは高価であり、ＡＯＭはレーザ光の強度を約１／１０００に減衰させるだけで、完全に励起レーザ光の混入を防げるものではなかった。

【０００８】本発明は、上述した従来技術における問題点を解決し、励起光源として連続発振レーザ（continuous-wave laser ；ＣＷレーザ）などの比較的安価なレーザを用い、簡単な構成で容易に高い検出精度を得ることのできる蛍光測光方法及び蛍光測光装置を提供することを目的とする。

【０００９】

【課題を解決するための手段】本発明では、励起光照射部と蛍光検出部を空間的に離して設定し、励起光照射部で励起光が照射された試料を励起光照射部から蛍光検出部に移動し、蛍光検出部で励起光の影響が全くない状態で蛍光検出を行うことでＳ／Ｎ比を向上し、前記目的を達成する。

【００１０】すなわち、本発明による蛍光測光方法は、励起光源からの励起光を試料に照射するステップと、励起光を照射された試料を蛍光検出手段の光軸上に移動するステップと、蛍光検出手段に入射した蛍光を検出するステップとを含むことを特徴とする。試料は、蛍光物質で標識された生体高分子を含む試料とすることができる。

【００１１】この方法では、励起光を照射された試料を、試料から発生される蛍光の寿命に比較して短い時間内に、励起光照射位置と異なる位置に向けられた蛍光検出手段の光軸上に移動して蛍光検出を行う。従って、励起光照射位置において試料から反射あるいは散乱した励起光が蛍光検出手段に入射することがないため、蛍光のみを高感度で検出することができる。

【００１２】本発明による蛍光測光装置は、励起光源と、励起光源からの励起光を試料に照射するための励起光照射手段と、励起光照射手段の光軸と試料上で交差しない光軸を有し、励起光照射によって試料から発せられた蛍光を検出するための蛍光検出手段と、励起光照射手段によって励起光を照射された試料を蛍光検出手段の光軸上に移動するための試料移動手段とを備えることを特徴とする。

【００１３】この蛍光測光装置は、励起光照射手段の光軸と蛍光検出手段の光軸が試料上で交差していない。そのため、励起光照射手段の下方に位置する試料に対して蛍光測光を行うことはできないが、蛍光寿命に比較して短い時間内に試料を蛍光検出手段の下方に移動して蛍光検出を行う。このように蛍光照射位置と蛍光検出位置を空間的に異なる位置に設定することにより、励起光照射位置において試料から反射あるいは散乱した励起光が蛍光検出手段に入射することがないため、蛍光のみを高感度で検出することが可能となる。

【００１４】蛍光検出手段は、ＰＭＴ等の光検出手段と、光検出手段の光検出面と試料面とが共役になった共焦点光学系を備えるのが好ましい。また、試料移動手段は試料を回転移動させる手段とすることができ、異なる波長の蛍光を検出するために前記励起光源と励起光照射手段と蛍光検出手段の組を複数組備えることができる。

【００１５】本発明に用いる蛍光物質は蛍光寿命の長いものが好ましく、Ｅｕ（ユーロピウム）錯体の蛍光物質である４，４’−bis（1",1",1",2",2",3",3"−heptafluoro−4",6"−hexanedion−6"−yl）chlorosulfo−o−terphenyl（略称：BHHCT）、ローダミン、ＦＩＴＣ、Ｃｙ３、Ｃｙ５などが好適である。例えばＢＨＨＣＴは、波長３４０ｎｍで励起されて波長６１５ｎｍの蛍光を出す蛍光物質で、蛍光の半減期が１００〜２００μｓｅｃと従来の蛍光物質の半減期（数十ｎｓｅｃ）に比べ、非常に長い。この特性を利用すると、励起光照射した試料を移動してから蛍光検出しても蛍光量を多く得ることができ、Ｓ／Ｎ比を飛躍的に向上することができる。

【００１６】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。図１は、本発明による蛍光測光装置の一例を示す概略図である。この装置は、円形のバイオチップの読み取りに好適な蛍光測光装置である。同心円状又は螺旋状に多数の試料スポット１１が配置されている円形のバイオチップ１０は、試料台１２上に保持されており、試料台１２は回転モータ１３によって矢印Ｒの方向に回転駆動される。バイオチップ１０の上方には、励起光源３０と、励起光照射光学系４０と、蛍光検出光学系５０とを備える光学ヘッド２０が配置されている。例えば直径５０μｍの微小なスポットである試料スポット１１上には、蛍光物質により標識されたＤＮＡや蛋白質などの生体高分子がプローブＤＮＡ等とハイブリダイズしている。

【００１７】励起光源３０としては、例えばＣＷレーザが用いられる。励起光源３０から発生されたレーザ光は励起光照射光学系４０に入射し、ミラー４１で反射され、対物レンズ４２で収束されてバイオチップ１０上の試料スポットに照射される。蛍光検出光学系５０は、受光レンズ５１、集光レンズ５２、蛍光選択フィルタ５３、スリット５４、光検出器５５としての光電子増倍管を備え、試料スポットから発生された蛍光を検出する。

【００１８】光学ヘッド２０はヘッド送りモータ１４によってバイオチップ１０の半径方向に移動・位置決めされる。バイオチップ１０上に試料スポットが１１同心円状に配置されている場合には、ヘッド送りモータ１４は光学ヘッド２０を試料スポットの各同心円に対してステップ的に位置決めし、バイオチップ１０上に試料スポット１１が螺旋状に配置されている場合には、ヘッド送りモータ１４は螺旋状の試料スポット１１を追跡するよう

に光学ヘッド２０を連続的に移動させる。モータ制御部１５は回転モータ１３とヘッド送りモータ１４を制御し、光学ヘッド２０の下方位置における試料スポット１１の移動速度が常に一定となるように、バイオチップ１０上における光学ヘッド２０の半径位置に応じて回転モータ１３の回転速度を可変制御する。

【００１９】図2は、励起光照射光学系と蛍光検出光学系の位置関係を説明する模式図である。図２（ａ）は、回転しているバイオチップ１０上の１つの試料スポット１１ａに励起光源（ＣＷレーザ）３０から発生された励起光が励起光照射光学系４０を介して照射され、試料スポット１１ａ中の蛍光物質が励起されている状態を示している。この後、図２（ｂ）に示すように、励起光が照射された試料スポット１１ａはバイオチップ１０の回転と共に移動し、蛍光検出光学系５０の真下にくる。この位置で、試料スポット１１ａから発生された蛍光が蛍光検出光学系５０に入射し、検出される。

【００２０】図3は、本発明による蛍光検出の原理を説明する模式図である。図３（ａ）は、移動しているバイオチップ上１０の試料スポット１１ａにＣＷレーザ３０からの励起光が照射されている状態を示す。試料スポット１１ａに標識蛍光物質が含まれていれば、励起光を照射された試料スポット１１ａから蛍光が発せられる。励起光照射光学系４０の下方位置を通過して励起光照射を受けた試料スポットは、励起光照射ののち一定時間経過後に、図３（ｂ）に示すように、蛍光検出光学系５０の下方位置に達する。蛍光検出光学系５０の受光レンズ５１と集光レンズ５２は共焦点光学系を構成している。試料スポット１１ａから発せられた蛍光は全方位に広がるが、共焦点光学系を構成する受光ンズ５１に入射した蛍光は集光レンズ５２によって収束され、光学フィルタ５３とスリット５４を通ることでノイズを除去され、光検出器（ＰＭＴ）５５に入射して検出される。こうして励起光の影響を受けずに蛍光測定を行うことが可能となる。なお、図3には、励起光照射光学系４０の光軸と蛍光検出光学系５０の光軸が平行になるように図示してあるが、２つの光学系４０，５０の光軸は必ずしも平行である必要はない。

【００２１】図4は、本発明による蛍光測光装置の他の例を説明する概略図である。この蛍光測光装置は２個の光学ヘッド２０ａ，２０ｂを備え、試料スポットに含まれる２種類の標識蛍光物質から発せられる蛍光を識別して検出する。光学ヘッド２０ａは励起光源（ＣＷレーザ）３０ａ、励起光照射光学系４０ａ、蛍光検出光学系５０ａを備え、光学ヘッド２０ｂは励起光源（ＣＷレーザ）３０ｂ、励起光照射光学系４０ｂ、蛍光検出光学系５０ｂを備える。励起光照射光学系４０ａ，４０ｂの詳細構成、及び蛍光検出光学系５０ａ，５０ｂの詳細構成は、図１に示した励起光照射光学系４０及び蛍光検出光学系５０の詳細構成と同じであるため、ここでは説明を省略する。

【００２２】ただし、励起光源３０ａ，３０ｂは、それぞれ異なる蛍光物質を効率よく励起できるように励起波長が選択され、蛍光検出光学系５０ａ，５０ｂは、それぞれ異なる蛍光物質からの蛍光を効率よく検出できるように透過波長帯域が選択された光学フィルタを備える。こうして、一方の光学ヘッド２０ａは、励起光照射光学系４０ａによって試料スポット１１ｂに励起光源３０ａからの励起光を照射し、一定時間後に蛍光検出光学系５０ａによって試料スポット１１ｂから発生される蛍光を励起光に邪魔されることなく測光して、例えば試料スポット１１ｂに含まれるＣｙ３を選択的に検出する。また、他方の光学ヘッド２０ｂは、励起光照射光学系４０ｂによって試料スポット１１ｃに励起光源３０ｂからの励起光を照射し、一定時間後に蛍光検出光学系５０ｂによって試料スポット１１ｃから発生される蛍光を励起光に邪魔されることなく測光して、例えば試料スポット１１ｃに含まれるＣｙ５を選択的に検出する。

【００２３】２つの光学ヘッド２０ａ，２０ｂはヘッド送りモータ１４ａ，１４ｂによってバイオチップ１０の半径方向に移動され、ほぼ同じ半径位置に位置決めされる。バイオチップ１０上に試料スポットが１１同心円状に配置されている場合には、ヘッド送りモータ１４ａ，１４ｂは光学ヘッド２０ａ，２０ｂを試料スポットの各同心円に対してステップ的に位置決めし、バイオチップ１０上に試料スポット１１が螺旋状に配置されている場合には、ヘッド送りモータ１４ａ，１４ｂは螺旋状の試料スポット１１を追跡するように光学ヘッド２０ａ，２０ｂを連続的に移動させる。モータ制御部１５は回転モータ１３とヘッド送りモータ１４ａ，１４ｂを制御し、光学ヘッド２０ａ，２０ｂの下方位置における試料スポット１１の移動速度が常にほぼ一定となるように、バイオチップ１０上における光学ヘッド２０，２０ｂの半径位置に応じて回転モータ１３の回転速度を可変制御する。

【００２４】

【発明の効果】本発明によると、励起光の影響を受けることなく試料スポットに含まれる蛍光物質からの蛍光を高感度に計測することができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明による蛍光測光装置の一例を示す概略図。

【図２】励起光照射光学系と蛍光検出光学系の位置関係を説明する模式図。

【図３】本発明による蛍光検出の原理を説明する模式図。

【図４】本発明による蛍光測光装置の他の例を説明する概略図。

【図５】従来の蛍光測光装置の概略図。

【符号の説明】

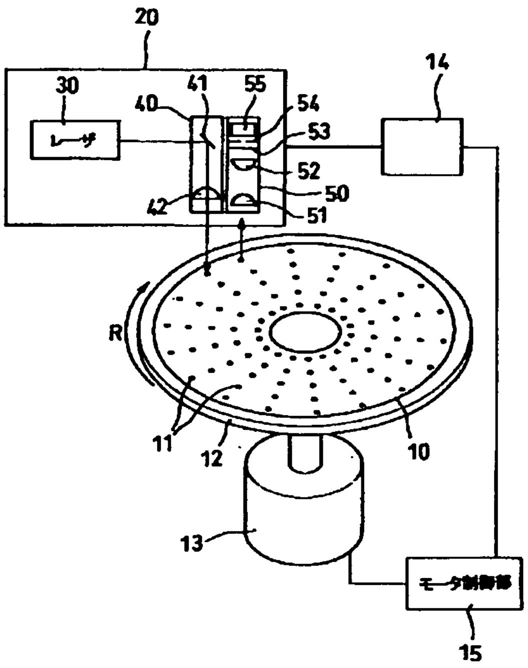
7

10…バイオチップ、11，11a，11b，11c…試料スポット、12…試料台、13…回転モータ、14，14a，14b…ヘッド送りモータ、15…モータ制御部、20，20a，20b…光学ヘッド、30，30a，30b…励起光源、40，40a，40b…励起光照射光学系、41…ミラー、42…対物レンズ、50，50a，50b…蛍光検出光学系、51…受光レンズ51、52…集光レンズ、53…蛍光選択フィルタ、

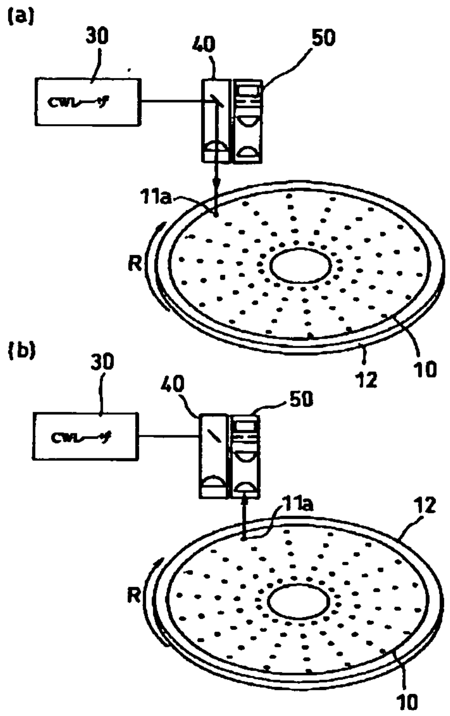
8

54…スリット、55…光検出器、100…バイオチップ、101…試料スポット、103…チップ送りモータ、105…レーザ、107…レーザ光、109…回転ミラー、111…モータ、113a，113b…光ファイバー束、115a，115b…光電子増倍管、117a，117b…光学フィルタ、119…モータ制御部、121…データ処理部

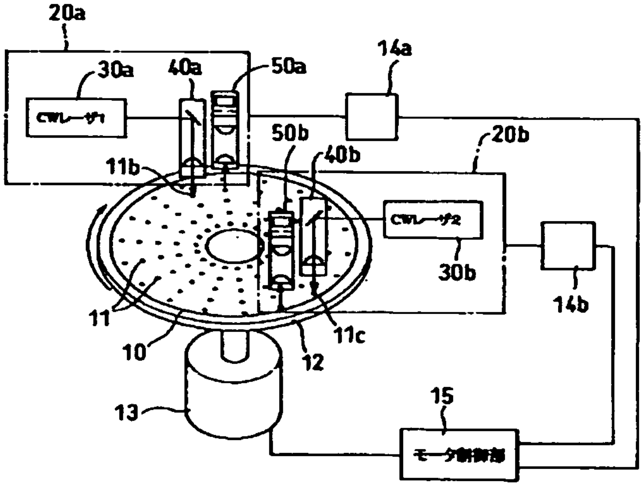
【図1】



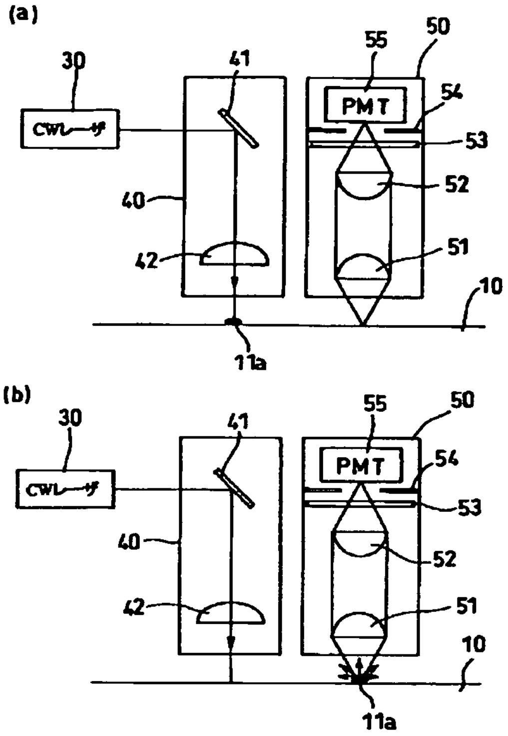
【図2】



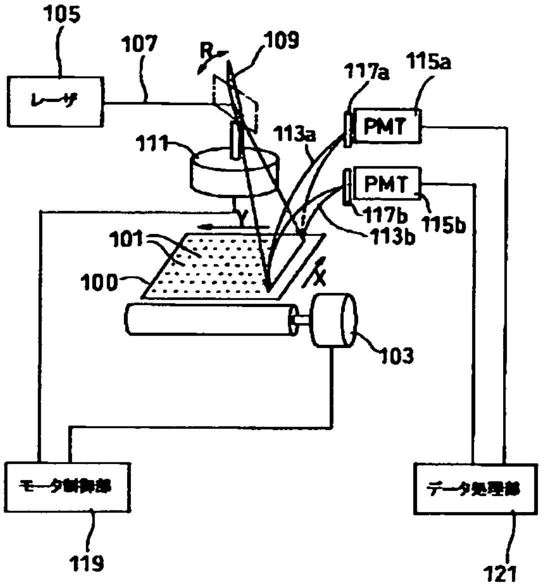
【図4】



【図３】



【図５】



フロントページの続き

(72)発明者　山本　顕次
神奈川県横浜市中区尾上町６丁目81番地
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社内

(72)発明者　宍戸　健太郎
神奈川県横浜市中区尾上町６丁目81番地
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社内

Ｆターム(参考)　2G043 AA04 BA16 CA03 DA05 EA01
FA01 FA06 GA01 GB01 GB19
KA09
2G054 AA08 AB10 CA22 CA23 EA03
EB02 FB02 FB03 GA05 JA02